

NOUVELLES SÉQUENCES PHOSPHORYLÉES DE LA PHOSPHATASE CDC25B, ANTICORPS DIRIGÉS CONTRE CES SÉQUENCES AINSI QUE LEUR UTILISATION

5

La présente invention a pour objet de nouvelles séquences phosphorylées de la phosphatase CDC25B ainsi que des anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre ces séquences. La présente invention a également pour objet l'utilisation de ces nouvelles séquences phosphorylées notamment pour la mise en œuvre d'une méthode

10

de diagnostic *in vitro* de cancers chez l'homme ou l'animal.

Les mécanismes qui contrôlent la division des cellules mettent en jeu de nombreux acteurs dont les activités sont régulées par des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation, impliquant des kinases et des phosphatases. Des dérégulations de ces mécanismes ont été identifiées dans de nombreux cancers. Leur identification et

15

leur caractérisation ouvrent aujourd'hui de nouvelles perspectives pour le diagnostic et le traitement de la maladie cancéreuse.

CDC25B est une phosphatase régulatrice du cycle cellulaire essentielle pour le contrôle de l'entrée en mitose. Elle appartient à une famille qui compte trois membres codés par des gènes différents (CDC25A, B et C) chez les mammifères. La protéine

20

25

30

CDC25B est exprimée et active en fin de phase G2 du cycle cellulaire (Baldin et al., 1997 ; Gabrielli et al., 1996). Sa localisation intracellulaire est régulée par des séquences NES et NLS (Davezac et al., 2000) et par son interaction avec les protéines 14-3-3 (Mils et al., 2000 ; Forrest et al., 2001). Il a été suggéré que CDC25B puisse agir comme un "starter" des événements mitotiques précoces (Nilsson et al., 2000). Elle pourrait jouer un rôle dans l'activation initiale d'une population de CDC2/cycline B au niveau du centrosome avant sa translocation nucléaire (Kumagai et al., 1992 ; Hoffmann et al., 1993). CDC25B active les complexes CDK/cycline pour permettre les remaniements architecturaux et biochimiques qui sont nécessaires pour permettre le processus de division cellulaire. Son activité est régulée par les variations de son expression, par son association à des partenaires régulateurs et par des événements de phosphorylation.

le gène STK15 localisé que le locus 20q13, un amplicon présent dans de nombreuses tumeurs. Cette protéine est localisée au niveau du centrosome (Dutertre et al., 2002). Sa fonction semble importante pour la séparation des centrosomes (Giet et al., 2000), leur duplication (Zhou et al., 1998) et l'assemblage d'un fuseau mitotique bipolaire (Giet et al., 2000). L'inhibition de sa fonction par la technologie de l'ARN interférence conduit à la formation de fuseaux monopolaires et sa surexpression est responsable d'une amplification centrosomale et d'une polyploïdisation (Meraldi et al., 2002 ; Bischoff et al., 1998 ; Zhou et al., 1998).

A ce jour, l'identification des substrats de la kinase Aurora A est encore très parcellaire. La phosphatase CDC25B est le premier substrat identifié qui est également co-localisé au niveau des centrosomes et joue un rôle clair dans le contrôle du cycle cellulaire et de la prolifération.

La présente invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs du site de phosphorylation *in vitro* de la phosphatase CDC25B par la kinase Aurora A, et de l'identification de la séquence phosphorylée du variant d'épissage CDC25B3 de CDC25B sur le résidu sérine en position 353.

L'un des buts de la présente invention consiste à fournir de nouvelles séquences phosphorylées des différents variants de la phosphatase CDC25B.

Un autre but de l'invention consiste à fournir un nouvel anticorps dirigé contre une phosphatase CDC25B phosphorylée, ledit anticorps pouvant être utilisé dans le cadre d'un diagnostic médical, ou pour la préparation de cribles pour l'identification de molécules liant ladite séquence phosphorylée et susceptibles de représenter de nouveaux agents utilisables en pharmacologie anti-tumorale.

Un autre but de l'invention consiste à fournir un nouvel outil pour l'étude des mécanismes moléculaires qui conduisent à la polyploïdisation et à la transformation cellulaire, ainsi qu'un nouvel outil permettant la mise en évidence de l'activité de la kinase Aurora A sur un de ses substrats physiologiques, et par conséquent l'identification d'éventuelles perturbations quantitatives, temporelles et spatiales de cette activité.

La présente invention concerne une séquence peptidique caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par un fragment d'au moins environ 10 acides aminés issus de la séquence SEQ ID NO : 1 suivante :

TPVQNKRRRS_pVTPPEEQQE

SEQ ID NO : 1

dans laquelle le résidu sérine en position 10 est phosphorylé, notamment par traitement *in vitro* de la séquence SEQ ID NO : 1 par la kinase Aurora A,

ledit fragment susmentionné contenant ledit résidu sérine phosphorylé.

L'expression "résidu phosphorylé" désigne un acide aminé porteur d'un groupement phosphate.

La présente invention concerne également une séquence peptidique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par la séquence SEQ ID NO : 2 suivante :

QNKRRRS_pVTPPEEQ

SEQ ID NO : 2

dans laquelle le résidu sérine en position 7 est phosphorylé.

La séquence SEQ ID NO : 2 correspond à un fragment de la séquence SEQ ID NO : 1 susmentionnée. Plus exactement, elle correspond au fragment de SEQ ID NO : 1 délimité de l'acide aminé en position 4 à l'acide aminé en position 17.

La présente invention concerne également une séquence peptidique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par l'une des séquences suivantes :

– la séquence SEQ ID NO : 3, représentant le variant d'épissage CDC25B1 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 339 est phosphorylé,

– la séquence SEQ ID NO : 4, représentant un variant d'épissage CDC25B2 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 312 est phosphorylé,

– la séquence SEQ ID NO : 5, représentant un variant d'épissage CDC25B3 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 353 est phosphorylé,

– la séquence SEQ ID NO : 6, représentant un variant d'épissage CDC25B4 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 374 est phosphorylé,

– la séquence SEQ ID NO : 7, représentant un variant d'épissage CDC25B5 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 361 est phosphorylé.

La présente invention concerne également un anticorps polyclonal ou monoclonal susceptible de reconnaître une séquence peptidique telle que définie précédemment.

Un anticorps polyclonal avantageux de l'invention est caractérisé en ce qu'il est susceptible de reconnaître la séquence SEQ ID NO : 2 telle que définie ci-dessus.

Un tel anticorps dirigé contre l'épitope phosphorylé de séquence SEQ ID NO : 2 est généré en immunisant des lapins avec ledit épitope.

5 Plus précisément, ledit épitope est couplé de façon covalente avec une protéine porteuse telle que l'hémocyanine, le BSA ou l'ovalbumine. Les lapins sont alors immunisés pendant 3 mois (4 injections au total) et la saignée finale permet la récupération d'environ 50 ml de sérum. Le sérum est ensuite doublement purifié par affinité sur une colonne de peptide phosphorylé puis sur une colonne de peptide non
10 phosphorylé.

La présente invention concerne également un procédé de préparation d'un anticorps monoclonal tel que défini ci-dessus, dirigé contre la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 telle que définie ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes
15 suivantes :

- 15 - l'immunisation d'un animal par injection de la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 telle que définie ci-dessus,
- la fusion entre des myélomes d'un animal et des splénocytes d'un animal afin d'obtenir des hybridomes,
- la mise en culture des hybridomes ainsi obtenus,
- 20 - la récupération et purification par clonage d'un hybridome, choisi parmi ceux obtenus à l'étape précédente et sécrétant un anticorps dirigé contre la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 telle que définie ci-dessus.

L'animal utilisé pour l'étape d'immunisation est notamment une souris.

Les myélomes utilisés pour la fusion proviennent notamment une souris.

25 Les splénocytes utilisés pour la fusion proviennent d'un animal de la même espèce que celle dont provient les myélomes, à savoir notamment une souris.

On choisit les hybridomes qui sécrètent les anticorps contre la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 sur la base de la production d'anticorps capables de reconnaître dans un test ELISA le peptide phosphorylé utilisé pour l'immunisation mais
30 pas le peptide non phosphorylé.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient à titre de substance active une séquence peptidique telle que définie précédemment, un anticorps tel que défini ci-dessus, ou un anticorps

anti-idiotypique tel que défini ci-dessus, en association avec un vecteur pharmaceutiquement acceptable.

Une composition pharmaceutique avantageuse selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle contient à titre de substance active la séquence peptidique représentée par la séquence SEQ ID NO : 2.

La présente invention concerne également l'utilisation d'une séquence peptidique telle que définie ci-dessus, d'un anticorps tel que défini ci-dessus, ou d'un anticorps anti-idiotypique tel que défini ci-dessus, pour la préparation de médicaments destinés au traitement de cancers, tels que les cancers du sein.

La présente invention concerne également l'utilisation d'un anticorps tel que défini ci-dessus, pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* de cancers chez l'homme ou l'animal, notamment de cancers du sein.

Selon un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne l'utilisation d'un anticorps polyclonal tel que défini ci-dessus, dirigé contre l'épitope phosphorylé de séquence SEQ ID NO : 2, pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* de cancers chez l'homme ou l'animal, notamment de cancers du sein.

La présente invention concerne également une méthode de diagnostic *in vitro* de cancers, notamment de cancers du sein, chez l'homme ou l'animal, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en présence d'un anticorps tel que défini ci-dessus, avec un échantillon biologique prélevé chez un individu, ledit anticorps étant le cas échéant fixé sur un support solide,

- la détection d'une séquence peptidique telle que définie ci-dessus, susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique à l'aide de réactifs marqués, notamment d'anticorps marqués, reconnaissant soit l'anticorps lié à ladite séquence peptidique, soit la séquence peptidique liée audit anticorps dans les complexes formés lors de l'étape précédente entre l'anticorps et la séquence peptidique susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique, et ce, le cas échéant, après rinçage approprié du support solide.

La présente invention concerne également une méthode de pronostic *in vitro* de cancers, notamment de cancers du sein, chez l'homme ou l'animal, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en présence d'un anticorps tel que défini ci-dessus, avec un échantillon tumoral prélevé chez un individu, ledit anticorps étant le cas échéant fixé sur un support solide,

– la détection d'une séquence peptidique telle que définie ci-dessus, susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique à l'aide de réactifs marqués, notamment d'anticorps marqués, reconnaissant soit l'anticorps lié à ladite séquence peptidique, soit la séquence peptidique liée audit anticorps dans les complexes formés lors de l'étape précédente entre l'anticorps et la séquence peptidique susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique, et ce, le cas échéant, après rinçage approprié du support solide.

La présente invention concerne également l'utilisation des anticorps susmentionnés de l'invention dirigés contre une séquence phosphorylée de CDC25B dans le cadre de la mise en œuvre d'un test de diagnostic visant à détecter sur des prélèvements tumoraux la présence ou non de cette séquence phosphorylée, ceci dans un but diagnostique ou pronostique.

La présente invention concerne également un procédé de criblage d'une molécule capable de se lier à une séquence peptidique telle que définie ci-dessus, ladite molécule étant susceptible d'être utilisée comme agent anti-tumoral ou agent anti-prolifératif tant sur les cellules en culture que chez un organisme vivant ou encore contre des agents infectieux (parasites, champignons pathogènes), caractérisé en ce qu'il comprend :

– la mise en présence de ladite molécule avec la séquence peptidique susmentionnée, et

– la détection de la liaison de ladite molécule par l'utilisation de méthodes de compétition appropriées, notamment par la compétition vis-à-vis de la liaison d'un anticorps tel que défini ci-dessus.

La liaison entre ladite molécule avec la séquence peptidique phosphorylée peut être détectée selon le procédé suivant : la séquence phosphorylée (substrat phosphorylé) est liée à un support solide ; l'incubation avec l'anticorps susmentionné en solution permet ensuite sa fixation qui est révélée par l'utilisation d'un anticorps secondaire porteur d'un chromophore ou par le marquage direct de l'anticorps primaire (anticorps de l'invention dirigé contre la séquence phosphorylée). L'incubation simultanée avec un composé capable de lier ladite séquence phosphorylée entraîne sa fixation et le masquage du site reconnu par l'anticorps. La visualisation de cette interaction pourra donc être réalisée et quantifiée par la baisse de liaison de l'anticorps.

DESCRIPTION DES FIGURES

La Figure 1 représente un spectre de masse du peptide monophosphorylé, 353-S_(p)VTPPEEQQEAEPPK-367. L'axe des abscisses correspond au rapport m/z et l'axe des ordonnées correspond au pourcentage d'abondance relative.

Les Figures 2A, 2B et 2C représentent les résultats d'analyses western blot avec l'anticorps monoclonal SE96 (Figure 2A), avec l'anticorps anti- α MBP (New England Biolabs)(Figure 2B) et avec l'anticorps anti- α Aurora A (voir demande de brevet français 02/07212)(Figure 2C). Dans ces Figures, la première colonne correspond à la protéine kinase Aurora A ; la seconde colonne à une protéine recombinante MBP-CDC25B ; la troisième colonne correspond à la protéine kinase Aurora A et à la protéine recombinante MBP-CDC25B et la quatrième colonne correspond à MBP seule.

Les Figures 3a à 3h représentent des images d'immunofluorescence indirecte réalisées sur des cellules HeLa avec l'anticorps SE96.

Dans les Figures 3a, 3c, 3e et 3g, les cellules HeLa ont été fixées et utilisées pour effectuer une analyse par immunofluorescence avec les anticorps SE96 et elles ont également été colorées avec du DAPI.

Dans les Figures 3b, 3d, 3f et 3h, les cellules HeLa ont été fixées et utilisées pour effectuer une analyse par immunofluorescence avec les anticorps SE96.

Les cellules HeLa des Figures 3c et 3d ont été mises en compétition avec le peptide phosphorylé ayant servi à l'immunisation (SEQ ID NO : 2) ; les cellules HeLa des Figures 3e et 3f ont été mises en compétition avec le peptide non phosphorylé (QNKRRRSVTPPEEQ) ; et les cellules HeLa des Figures 3g et 3h ont été mises en compétition avec un peptide phosphorylé sans rapport avec la serine 353 (MEVEELS_(p)PLALGR).

Ces Figures démontrent que le marquage observé avec l'anticorps SE96 est bien éliminé par le peptide immunogène sous sa forme phosphorylée, mais pas par le même peptide non phosphorylé. Par ailleurs, un peptide phosphorylé irrelevant n'a aucun effet compétiteur, démontrant la spécificité vis-à-vis de la séquence phosphorylé et non de la présence du groupement phosphate uniquement.

METHODES ET RESULTATS

La kinase Aurora A recombinante phosphoryle CDC25B3 sur la sérine 353

La protéine recombinante CDC25B3 est phosphorylée *in vitro* par la kinase recombinante Aurora A. Le produit de la réaction de phosphorylation a été analysé par spectrométrie de masse après excision du gel d'électrophorèse et digestion tryptique. Le spectre MS/MS du peptide monophosphorylé, 353-SVTPPEEQQEAEPPK-367 est présenté en Figure 1. Son analyse indique que c'est la sérine 353 qui est phosphorylée par la kinase.

De même, il a été montré que la kinase Aurora A recombinante phosphoryle CDC25B1 sur la sérine 339, CDC25B2 sur la sérine 312, CDC25B4 sur la sérine 374 et CDC25B5 sur la sérine 361.

Production d'anticorps contre la protéine CDC25B phosphorylée par la kinase Aurora A

Le peptide de séquence QNKRRRS(p)VTPPEEQ (SEQ ID NO : 2) a été utilisé pour l'immunisation de lapins. Après sacrifice des animaux, le sérum a été purifié par chromatographie en deux étapes : la première sur une colonne de peptide phosphorylé pour retenir les anticorps spécifiques, puis la deuxième sur une colonne du même peptide non phosphorylé de séquence QNKRRRSVTPPEEQ, de manière à purifier dans l'éluat les anticorps spécifiques de la forme phosphorylée. La reconnaissance du peptide phosphorylé par les anticorps a été validée dans un test ELISA. Dans la suite du document, ces anticorps seront désignés sous le nom de SE96.

L'anticorps SE96 reconnaît CDC25B phosphorylé par Aurora A

Des protéines recombinantes CDC25B-MBP (Maltose Binding protein) ou MBP seule ont été incubées en présence ou non de kinase Aurora A. Les échantillons ont ensuite été analysés par transfert de protéines (western blot) avec l'anticorps SE96 et des anticorps permettant la reconnaissance de la MBP et d'Aurora A. Comme le montre la Figure 2, la protéine CDC25B phosphorylée par Aurora A est reconnue par SE96, ce qui valide l'utilisation de cet anticorps dans un test Western blot.

La protéine CDC25B phosphorylée sur la sérine 353 est localisée au niveau du centrosome

Des cellules HeLa ont été fixées et utilisées pour effectuer une analyse par immunofluorescence avec les anticorps SE96. Les cellules ont également été colorées avec le 4'-6 diamino-2-phenylindole (DAPI) pour localiser le noyau. Les images présentées à la Figure 3 sont représentatives d'observations sur un grand nombre de cellules. Elles indiquent que la protéine CDC25B phosphorylée sur la sérine 353 est localisée au niveau des centrosomes des cellules en mitose. Ce marquage est aboli lorsqu'une compétition est réalisée avec le peptide phosphorylé ayant servi à l'immunisation (SEQ ID NO : 2), mais pas avec le peptide non phosphorylé (QNKRRRSVTPPEEQ) ni avec un peptide phosphorylé sans rapport avec la serine 353 (MEVEELS(p)PLALGR). Ces observations valident l'utilisation de ce réactif en immunofluorescence.

RÉFÉRENCES

- Baldin, V., Cans, C., Superti-Furga, G. & Ducommun, B (1997) Alternative splicing of the human CDC25B tyrosine phosphatase. Possible implications for growth control? *Oncogene*, **14**, 2485-2495,
- Bischoff, J. R. et al. (1998) A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers, *EMBO J*, **17**, 3052-65,
- Davezac, N. et al. (2000) Regulation of CDC25B phosphatases subcellular localization, *Oncogene*, **19**, 2179-85,
- Dutertre, S., Descamps, S. & Prigent, C. (2002) On the role of aurora-A in centrosome function, *Oncogene*, **21**, 6175-83,
- Forrest, A. & Gabrielli, B. (2001) Cdc25B activity is regulated by 14-3-3, *Oncogene*, **20**, 4393-401,
- Gabrielli, B. G. et al. (1996) Cytoplasmic accumulation of CDC25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells, *J. Cell. Science*, **109**, 1081-1093,
- Giet, R. & Prigent, C. (2000) The *Xenopus laevis* aurora/Ip11p-related kinase pEg2 participates in the stability of the bipolar mitotic spindle, *Exp Cell Res*, **258**, 145-51,
- Giet, R. et al. (2002) Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules, *J Cell Biol*, **156**, 437-51,
- Hoffmann, I., Clarke, P., Marcote, M. J., Karsenti, E. & Draetta, G. (1993) Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self amplification of MPF at mitosis, *EMBO J*, **12**, 53-63,
- Kumagai, A. & Dunphy, W. (1992) Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts, *Cell*, **70**, 139-151,
- Meraldi, P., Honda, R. & Nigg, E. A. (2002) Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells, *Embo J*, **21**, 483-92,
- Mils, V. et al. (2000) Specific interaction between 14.3.3 isoforms and the human CDC25B phosphatase, *Oncogene*, **19**, 1257-1265,
- Nilsson, I. & Hoffmann, I. (2000) Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family, *Prog Cell Cycle Res*, **4**, 107-14,
- Zhou, H. et al. (1998) Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation, *Nat Genet*, **20**, 189-93.

REVENDICATIONS

1. Séquence peptidique caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée
5 par un fragment d'au moins environ 10 acides aminés issus de la séquence
SEQ ID NO : 1 suivante :

TPVQNKRRRS_pVTPPEEQQE

SEQ ID NO : 1

dans laquelle le résidu sérine en position 10 est phosphorylé,
10 ledit fragment susmentionné contenant ledit résidu sérine phosphorylé.

2. Séquence peptidique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle
comprend ou est constituée par la séquence SEQ ID NO : 2 suivante :

QNKRRRS_pVTPPEEQ

SEQ ID NO : 2

15 dans laquelle le résidu sérine en position 7 est phosphorylé.

3. Séquence peptidique selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle
comprend ou est constituée par l'une des séquences suivantes :

– la séquence SEQ ID NO : 3, représentant le variant d'épissage CDC25B1 de la
protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position
20 339 est phosphorylé, ou

– la séquence SEQ ID NO : 4, représentant un variant d'épissage CDC25B2 de la
protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position
312 est phosphorylé, ou

25 – la séquence SEQ ID NO : 5, représentant un variant d'épissage CDC25B3 de la
protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position
353 est phosphorylé, ou

– la séquence SEQ ID NO : 6, représentant un variant d'épissage CDC25B4 de la
protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position
374 est phosphorylé, ou

30 – la séquence SEQ ID NO : 7, représentant un variant d'épissage CDC25B5 de la
protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position
361 est phosphorylé.

4. Anticorps polyclonal ou monoclonal susceptible de reconnaître une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

5. Anticorps polyclonal susceptible de reconnaître la séquence SEQ ID NO : 2 telle que définie dans la revendication 2.

6. Procédé de préparation d'un anticorps monoclonal selon la revendication 4, dirigé contre la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 telle que définie dans la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- l'immunisation d'un animal par injection de la séquence peptidique selon la revendication 2,
- la fusion entre des myélomes d'un animal et des splénocytes d'un animal afin d'obtenir des hybridomes,
- la mise en culture des hybridomes ainsi obtenus, et
- la récupération et purification par clonage d'un hybridome, choisi parmi ceux obtenus à l'étape précédente et sécrétant un anticorps dirigé contre la séquence peptidique selon la revendication 2.

7. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient à titre de substance active une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, un anticorps selon la revendication 4 ou 5, en association avec un vecteur pharmaceutiquement acceptable.

8. Utilisation d'une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, d'un anticorps selon la revendication 4 ou 5, pour la préparation de médicaments destinés au traitement de cancers, tels que les cancers du sein.

9. Utilisation d'un anticorps selon la revendication 4 ou 5, pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic ou pronostic *in vitro* de cancers chez l'homme ou l'animal, notamment de cancers du sein.

10. Méthode de diagnostic ou pronostic *in vitro* de cancers, notamment de cancers du sein, chez l'homme ou l'animal, caractérisée en ce qu'elle comprend :

– la mise en présence d'un anticorps selon la revendication 4 ou 5, avec un échantillon biologique prélevé chez un individu, ledit anticorps étant le cas échéant fixé sur un support solide, et

– la détection d'une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique à l'aide de réactifs marqués, notamment d'anticorps marqués, reconnaissant soit l'anticorps lié à ladite séquence peptidique, soit la séquence peptidique liée audit anticorps dans les complexes formés lors de l'étape précédente entre l'anticorps et la séquence peptidique susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique, et ce, le cas échéant, après rinçage approprié du support solide.

11. Procédé de criblage d'une molécule capable de se lier à une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ladite molécule étant susceptible d'être utilisée comme agent anti-tumoral ou agent anti-prolifératif, caractérisé en ce qu'il comprend :

– la mise en présence de ladite molécule avec la séquence peptidique susmentionnée, et

– la détection de la liaison de ladite molécule par l'utilisation de méthodes de compétition appropriées, notamment par la compétition vis-à-vis de la liaison d'un anticorps selon la revendication 4 ou 5.

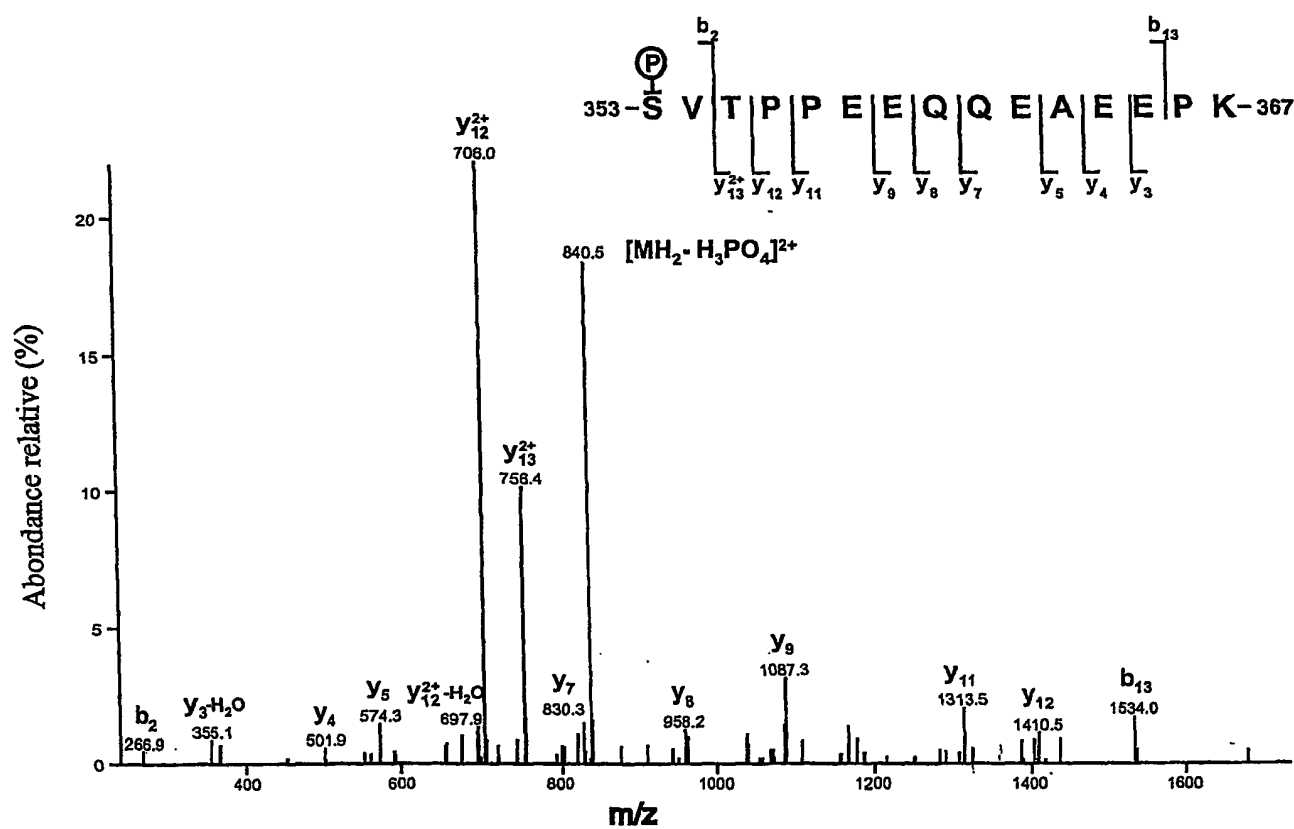


FIGURE 1

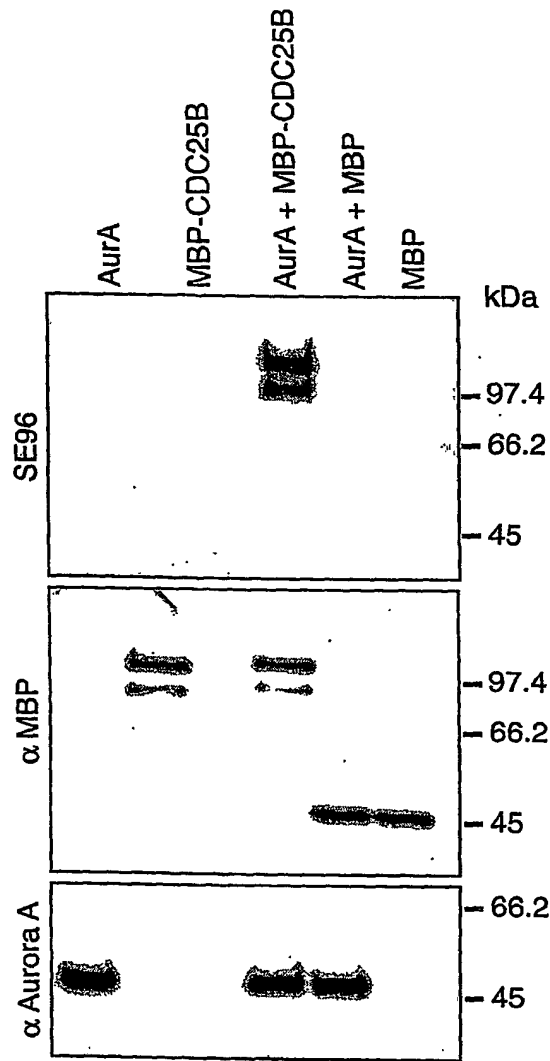
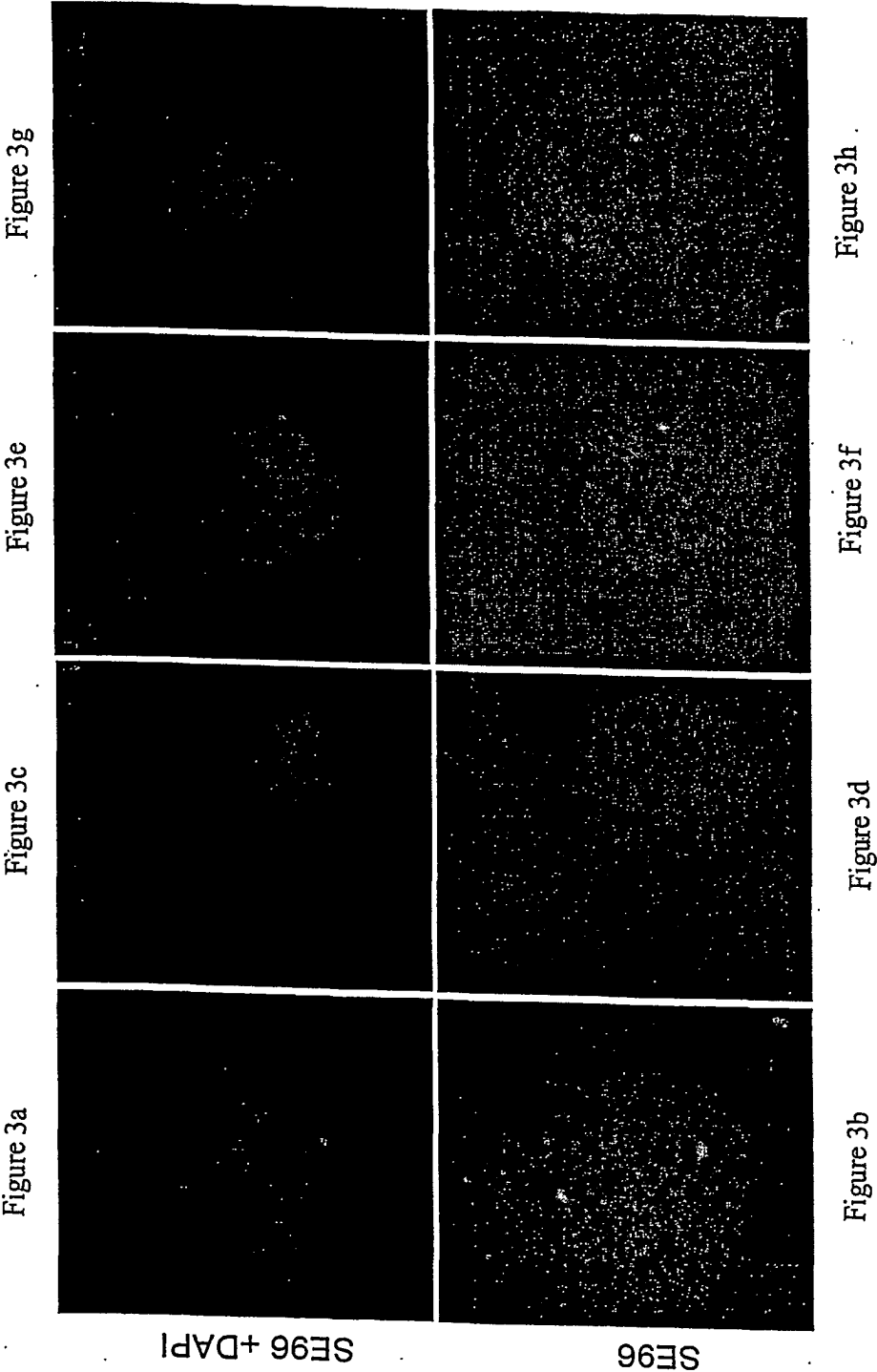


FIGURE 2



LISTE DE SEQUENCES

- <110> CNRS
UNIVERSITE DE RENNES I
UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III
- <120> NOUVELLES SEQUENCES PHOSPHORYLEES DE LA PHOSPHATASE CDC25B,
ANTICORPS DIRIGES CONTRE CES SEQUENCES AINSI QUE
LEUR UTILISATION
- <130> WOB 03 BH CNR CD25
- <150> FR 03/07095
<151> 2003-06-12
- <160> 7
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
<211> 19
<212> PRT
<213> homo sapiens
- <220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> PHOSPHORYLATION
- <400> 1
Thr Pro Val Gln Asn Lys Arg Arg Arg Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu
1 5 10 15
Gln Gln Glu
- <210> 2
<211> 14
<212> PRT
<213> homo sapiens
- <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> PHOSPHORYLATION
- <400> 2
Gln Asn Lys Arg Arg Arg Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu Gln
1 5 10
- <210> 3
<211> 566
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- <220>
<221> MOD_RES
<222> (339)..(339)
<223> PHOSPHORYLATION

<400> 3

Met Glu Val Pro Gln Pro Glu Pro Ala Pro Gly Ser Ala Leu Ser Pro
 1 5 10 15

Ala Gly Val Cys Gly Gly Ala Gln Arg Pro Gly His Leu Pro Gly Leu
 20 25 30

Leu Leu Gly Ser His Gly Leu Leu Gly Ser Pro Val Arg Ala Ala Ala
 35 40 45

Ser Ser Pro Val Thr Thr Leu Thr Gln Thr Met His Asp Leu Ala Gly
 50 55 60

Leu Gly Ser Arg Ser Arg Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Arg Arg Ala
 65 70 75 80

Ser Glu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ala Gly
 85 90 95

Leu Cys Met Asp Ser Pro Ser Pro Met Asp Pro His Met Ala Glu Gln
 100 105 110

Thr Phe Glu Gln Ala Ile Gln Ala Ala Ser Arg Ile Ile Arg Asn Glu
 115 120 125

Gln Phe Ala Ile Arg Arg Phe Gln Ser Met Pro Val Arg Leu Leu Gly
 130 135 140

His Ser Pro Val Leu Arg Asn Ile Thr Asn Ser Gln Ala Pro Asp Gly
 145 150 155 160

Arg Arg Lys Ser Glu Ala Gly Ser Gly Ala Ala Ser Ser Ser Gly Glu
 165 170 175

Asp Lys Glu Asn Asp Gly Phe Val Phe Lys Met Pro Trp Lys Pro Thr
 180 185 190

His Pro Ser Ser Thr His Ala Leu Ala Glu Trp Ala Ser Arg Arg Glu
 195 200 205

Ala Phe Ala Gln Arg Pro Ser Ser Ala Pro Asp Leu Met Cys Leu Ser
 210 215 220

Pro Asp Arg Lys Met Glu Val Glu Glu Leu Ser Pro Leu Ala Leu Gly
 225 230 235 240

Arg Phe Ser Leu Thr Pro Ala Glu Gly Asp Thr Glu Glu Asp Asp Gly
 245 250 255

Phe Val Asp Ile Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asp Asp Asp Ala Val Pro
 260 265 270

Pro Gly Met Glu Ser Leu Ile Ser Ala Pro Leu Val Lys Thr Leu Glu
 275 280 285

Lys Glu Glu Glu Lys Asp Leu Val Met Tyr Ser Lys Cys Gln Arg Leu
 290 295 300

Phe Arg Ser Pro Ser Met Pro Cys Ser Val Ile Arg Pro Ile Leu Lys
 305 310 315 320

Arg Leu Glu Arg Pro Gln Asp Arg Asp Thr Pro Val Gln Asn Lys Arg
 325 330 335
 Arg Arg Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu Gln Gln Glu Ala Glu Glu Pro
 340 345 350
 Lys Ala Arg Val Leu Arg Ser Lys Ser Leu Cys His Asp Glu Ile Glu
 355 360 365
 Asn Leu Leu Asp Ser Asp His Arg Glu Leu Ile Gly Asp Tyr Ser Lys
 370 375 380
 Ala Phe Leu Leu Gln Thr Val Asp Gly Lys His Gln Asp Leu Lys Tyr
 385 390 395 400
 Ile Ser Pro Glu Thr Met Val Ala Leu Leu Thr Gly Lys Phe Ser Asn
 405 410 415
 Ile Val Asp Lys Phe Val Ile Val Asp Cys Arg Tyr Pro Tyr Glu Tyr
 420 425 430
 Glu Gly Gly His Ile Lys Thr Ala Val Asn Leu Pro Leu Glu Arg Asp
 435 440 445
 Ala Glu Ser Phe Leu Leu Lys Ser Pro Ile Ala Pro Cys Ser Leu Asp
 450 455 460
 Lys Arg Val Ile Leu Ile Phe His Cys Glu Phe Ser Ser Glu Arg Gly
 465 470 475 480
 Pro Arg Met Cys Arg Phe Ile Arg Glu Arg Asp Arg Ala Val Asn Asp
 485 490 495
 Tyr Pro Ser Leu Tyr Tyr Pro Glu Met Tyr Ile Leu Lys Gly Gly Tyr
 500 505 510
 Lys Glu Phe Phe Pro Gln His Pro Asn Phe Cys Glu Pro Gln Asp Tyr
 515 520 525
 Arg Pro Met Asn His Glu Ala Phe Lys Asp Glu Leu Lys Thr Phe Arg
 530 535 540
 Leu Lys Thr Arg Ser Trp Ala Gly Glu Arg Ser Arg Arg Glu Leu Cys
 545 550 555 560
 Ser Arg Leu Gln Asp Gln
 565

<210> 4
 <211> 539
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (312)..(312)
 <223> PHOSPHORYLATION

<400> 4

Met Glu Val Pro Gln Pro Glu Pro Ala Pro Gly Ser Ala Leu Ser Pro
 1 5 10 15
 Ala Gly Val Cys Gly Gly Ala Gln Arg Pro Gly His Leu Pro Gly Leu
 20 25 30
 Leu Leu Gly Ser His Gly Leu Leu Gly Ser Pro Val Arg Ala Ala Ala
 35 40 45
 Ser Ser Pro Val Thr Thr Leu Thr Gln Thr Met His Asp Leu Ala Gly
 50 55 60
 Leu Gly Ser Glu Thr Pro Lys Ser Gln Val Gly Thr Leu Leu Phe Arg
 65 70 75 80
 Ser Arg Ser Arg Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Arg Arg Ala Ser Glu
 85 90 95
 Ser Ser Leu Ser Ser Glu Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ala Gly Leu Cys
 100 105 110
 Met Asp Ser Pro Ser Pro Met Asp Pro His Met Ala Glu Gln Thr Phe
 115 120 125
 Glu Gln Ala Ile Gln Ala Ala Ser Arg Ile Ile Arg Asn Glu Gln Phe
 130 135 140
 Ala Ile Arg Arg Phe Gln Ser Met Pro Asp Gly Phe Val Phe Lys Met
 145 150 155 160
 Pro Trp Lys Pro Thr His Pro Ser Ser Thr His Ala Leu Ala Glu Trp
 165 170 175
 Ala Ser Arg Arg Glu Ala Phe Ala Gln Arg Pro Ser Ser Ala Pro Asp
 180 185 190
 Leu Met Cys Leu Ser Pro Asp Arg Lys Met Glu Val Glu Glu Leu Ser
 195 200 205
 Pro Leu Ala Leu Gly Arg Phe Ser Leu Thr Pro Ala Glu Gly Asp Thr
 210 215 220
 Glu Glu Asp Asp Gly Phe Val Asp Ile Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asp
 225 230 235 240
 Asp Asp Ala Val Pro Pro Gly Met Glu Ser Leu Ile Ser Ala Pro Leu
 245 250 255
 Val Lys Thr Leu Glu Lys Glu Glu Glu Lys Asp Leu Val Met Tyr Ser
 260 265 270
 Lys Cys Gln Arg Leu Phe Arg Ser Pro Ser Met Pro Cys Ser Val Ile
 275 280 285
 Arg Pro Ile Leu Lys Arg Leu Glu Arg Pro Gln Asp Arg Asp Thr Pro
 290 295 300
 Val Gln Asn Lys Arg Arg Arg Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu Gln Gln
 305 310 315 320

Glu Ala Glu Glu Pro Lys Ala Arg Val Leu Arg Ser Lys Ser Leu Cys
 325 330 335
 His Asp Glu Ile Glu Asn Leu Leu Asp Ser Asp His Arg Glu Leu Ile
 340 345 350
 Gly Asp Tyr Ser Lys Ala Phe Leu Leu Gln Thr Val Asp Gly Lys His
 355 360 365
 Gln Asp Leu Lys Tyr Ile Ser Pro Glu Thr Met Val Ala Leu Leu Thr
 370 375 380
 Gly Lys Phe Ser Asn Ile Val Asp Lys Phe Val Ile Val Asp Cys Arg
 385 390 395 400
 Tyr Pro Tyr Glu Tyr Glu Gly Gly His Ile Lys Thr Ala Val Asn Leu
 405 410 415
 Pro Leu Glu Arg Asp Ala Glu Ser Phe Leu Leu Lys Ser Pro Ile Ala
 420 425 430
 Pro Cys Ser Leu Asp Lys Arg Val Ile Leu Ile Phe His Cys Glu Phe
 435 440 445
 Ser Ser Glu Arg Gly Pro Arg Met Cys Arg Phe Ile Arg Glu Arg Asp
 450 455 460
 Arg Ala Val Asn Asp Tyr Pro Ser Leu Tyr Tyr Pro Glu Met Tyr Ile
 465 470 475 480
 Leu Lys Gly Gly Tyr Lys Glu Phe Phe Pro Gln His Pro Asn Phe Cys
 485 490 495
 Glu Pro Gln Asp Tyr Arg Pro Met Asn His Glu Ala Phe Lys Asp Glu
 500 505 510
 Leu Lys Thr Phe Arg Leu Lys Thr Arg Ser Trp Ala Gly Glu Arg Ser
 515 520 525
 Arg Arg Glu Leu Cys Ser Arg Leu Gln Asp Gln
 530 535

<210> 5
 <211> 580
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (353)..(353)
 <223> PHOSPHORYLATION

<400> 5
 Met Glu Val Pro Gln Pro Glu Pro Ala Pro Gly Ser Ala Leu Ser Pro
 1 5 10 15
 Ala Gly Val Cys Gly Gly Ala Gln Arg Pro Gly His Leu Pro Gly Leu
 20 25 30

Leu Leu Gly Ser His Gly Leu Leu Gly Ser Pro Val Arg Ala Ala Ala
 35 40 45
 Ser Ser Pro Val Thr Thr Leu Thr Gln Thr Met His Asp Leu Ala Gly
 50 55 60
 Leu Gly Ser Glu Thr Pro Lys Ser Gln Val Gly Thr Leu Leu Phe Arg
 65 70 75 80
 Ser Arg Ser Arg Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Arg Arg Ala Ser Glu
 85 90 95
 Ser Ser Leu Ser Ser Glu Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ala Gly Leu Cys
 100 105 110
 Met Asp Ser Pro Ser Pro Met Asp Pro His Met Ala Glu Gln Thr Phe
 115 120 125
 Glu Gln Ala Ile Gln Ala Ala Ser Arg Ile Ile Arg Asn Glu Gln Phe
 130 135 140
 Ala Ile Arg Arg Phe Gln Ser Met Pro Val Arg Leu Leu Gly His Ser
 145 150 155 160
 Pro Val Leu Arg Asn Ile Thr Asn Ser Gln Ala Pro Asp Gly Arg Arg
 165 170 175
 Lys Ser Glu Ala Gly Ser Gly Ala Ala Ser Ser Ser Gly Glu Asp Lys
 180 185 190
 Glu Asn Asp Gly Phe Val Phe Lys Met Pro Trp Lys Pro Thr His Pro
 195 200 205
 Ser Ser Thr His Ala Leu Ala Glu Trp Ala Ser Arg Arg Glu Ala Phe
 210 215 220
 Ala Gln Arg Pro Ser Ser Ala Pro Asp Leu Met Cys Leu Ser Pro Asp
 225 230 235 240
 Arg Lys Met Glu Val Glu Glu Leu Ser Pro Leu Ala Leu Gly Arg Phe
 245 250 255
 Ser Leu Thr Pro Ala Glu Gly Asp Thr Glu Glu Asp Asp Gly¹ Phe Val
 260 265 270
 Asp Ile Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asp Asp Asp Ala Val Pro Pro Gly
 275 280 285
 Met Glu Ser Leu Ile Ser Ala Pro Leu Val Lys Thr Leu Glu Lys Glu
 290 295 300
 Glu Glu Lys Asp Leu Val Met Tyr Ser Lys Cys Gln Arg Leu Phe Arg
 305 310 315 320
 Ser Pro Ser Met Pro Cys Ser Val Ile Arg Pro Ile Leu Lys Arg Leu
 325 330 335
 Glu Arg Pro Gln Asp Arg Asp Thr Pro Val Gln Asn Lys Arg Arg Arg
 340 345 350

Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu Gln Gln Glu Ala Glu Glu Pro Lys Ala
 355 360 365
 Arg Val Leu Arg Ser Lys Ser Leu Cys His Asp Glu Ile Glu Asn Leu
 370 375 380
 Leu Asp Ser Asp His Arg Glu Leu Ile Gly Asp Tyr Ser Lys Ala Phe
 385 390 395 400
 Leu Leu Gln Thr Val Asp Gly Lys His Gln Asp Leu Lys Tyr Ile Ser
 405 410 415
 Pro Glu Thr Met Val Ala Leu Leu Thr Gly Lys Phe Ser Asn Ile Val
 420 425 430
 Asp Lys Phe Val Ile Val Asp Cys Arg Tyr Pro Tyr Glu Tyr Glu Gly
 435 440 445
 Gly His Ile Lys Thr Ala Val Asn Leu Pro Leu Glu Arg Asp Ala Glu
 450 455 460
 Ser Phe Leu Leu Lys Ser Pro Ile Ala Pro Cys Ser Leu Asp Lys Arg
 465 470 475 480
 Val Ile Leu Ile Phe His Cys Glu Phe Ser Ser Glu Arg Gly Pro Arg
 485 490 495
 Met Cys Arg Phe Ile Arg Glu Arg Asp Arg Ala Val Asn Asp Tyr Pro
 500 505 510
 Ser Leu Tyr Tyr Pro Glu Met Tyr Ile Leu Lys Gly Gly Tyr Lys Glu
 515 520 525
 Phe Phe Pro Gln His Pro Asn Phe Cys Glu Pro Gln Asp Tyr Arg Pro
 530 535 540
 Met Asn His Glu Ala Phe Lys Asp Glu Leu Lys Thr Phe Arg Leu Lys
 545 550 555 560
 Thr Arg Ser Trp Ala Gly Glu Arg Ser Arg Arg Glu Leu Cys Ser Arg
 565 570 575
 Leu Gln Asp Gln
 580

<210> 6
 <211> 601
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (374)..(374)
 <223> PHOSPHORYLATION

<400> 6
 Met Glu Val Pro Gln Pro Glu Pro Ala Pro Gly Ser Ala Leu Ser Pro
 1 5 10 15

Ala Gly Val Cys Gly Gly Ala Gln Arg Pro Gly His Leu Pro Gly Leu
 20 25 30

Leu Leu Gly Ser His Gly Leu Leu Gly Ser Pro Val Arg Ala Ala Ala
 35 40 45

Ser Ser Pro Val Thr Thr Leu Thr Gln Thr Met His Asp Leu Ala Gly
 50 55 60

Leu Gly Ser Arg Ser Arg Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Arg Arg Ala
 65 70 75 80

Ser Glu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ala Gly
 85 90 95

Leu Cys Met Asp Ser Pro Ser Pro Met Asp Pro His Met Ala Glu Gln
 100 105 110

Thr Phe Glu Gln Ala Ile Gln Ala Ala Ser Arg Ile Ile Arg Asn Glu
 115 120 125

Gln Phe Ala Ile Arg Arg Phe Gln Ser Met Pro Val Arg Leu Leu Gly
 130 135 140

His Ser Pro Val Leu Arg Asn Ile Thr Asn Ser Gln Ala Pro Asp Gly
 145 150 155 160

Arg Arg Lys Ser Glu Ala Gly Ser Gly Ala Ala Ser Ser Ser Gly Glu
 165 170 175

Asp Lys Glu Asn Val Arg Phe Trp Lys Ala Gly Val Gly Ala Leu Arg
 180 185 190

Glu Glu Glu Gly Ala Cys Trp Gly Gly Ser Leu Ala Cys Glu Asp Pro
 195 200 205

Pro Leu Pro Ser Trp Leu Gln Asp Gly Phe Val Phe Lys Met Pro Trp
 210 215 220

Lys Pro Thr His Pro Ser Ser Thr His Ala Leu Ala Glu Trp Ala Ser
 225 230 235 240

Arg Arg Glu Ala Phe Ala Gln Arg Pro Ser Ser Ala Pro Asp Leu Met
 245 250 255

Cys Leu Ser Pro Asp Arg Lys Met Glu Val Glu Glu Leu Ser Pro Leu
 260 265 270

Ala Leu Gly Arg Phe Ser Leu Thr Pro Ala Glu Gly Asp Thr Glu Glu
 275 280 285

Asp Asp Gly Phe Val Asp Ile Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asp Asp Asp
 290 295 300

Ala Val Pro Pro Gly Met Glu Ser Leu Ile Ser Ala Pro Leu Val Lys
 305 310 315 320

Thr Leu Glu Lys Glu Glu Glu Lys Asp Leu Val Met Tyr Ser Lys Cys
 325 330 335

Gln Arg Leu Phe Arg Ser Pro Ser Met Pro Cys Ser Val Ile Arg Pro
 340 345 350
 Ile Leu Lys Arg Leu Glu Arg Pro Gln Asp Arg Asp Thr Pro Val Gln
 355 360 365
 Asn Lys Arg Arg Arg Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu Gln Gln Glu Ala
 370 375 380
 Glu Glu Pro Lys Ala Arg Val Leu Arg Ser Lys Ser Leu Cys His Asp
 385 390 395 400
 Glu Ile Glu Asn Leu Leu Asp Ser Asp His Arg Glu Leu Ile Gly Asp
 405 410 415
 Tyr Ser Lys Ala Phe Leu Leu Gln Thr Val Asp Gly Lys His Gln Asp
 420 425 430
 Leu Lys Tyr Ile Ser Pro Glu Thr Met Val Ala Leu Leu Thr Gly Lys
 435 440 445
 Phe Ser Asn Ile Val Asp Lys Phe Val Ile Val Asp Cys Arg Tyr Pro
 450 455 460
 Tyr Glu Tyr Glu Gly Gly His Ile Lys Thr Ala Val Asn Leu Pro Leu
 465 470 475 480
 Glu Arg Asp Ala Glu Ser Phe Leu Leu Lys Ser Pro Ile Ala Pro Cys
 485 490 495
 Ser Leu Asp Lys Arg Val Ile Leu Ile Phe His Cys Glu Phe Ser Ser
 500 505 510
 Glu Arg Gly Pro Arg Met Cys Arg Phe Ile Arg Glu Arg Asp Arg Ala
 515 520 525
 Val Asn Asp Tyr Pro Ser Leu Tyr Tyr Pro Glu Met Tyr Ile Leu Lys
 530 535 540
 Gly Gly Tyr Lys Glu Phe Phe Pro Gln His Pro Asn Phe Cys Glu Pro
 545 550 555 560
 Gln Asp Tyr Arg Pro Met Asn His Glu Ala Phe Lys Asp Glu Leu Lys
 565 570 575
 Thr Phe Arg Leu Lys Thr Arg Ser Trp Ala Gly Glu Arg Ser Arg Arg
 580 585 590
 Glu Leu Cys Ser Arg Leu Gln Asp Gln
 595 600

<210> 7
 <211> 588
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (361)..(361)
 <223> PHOSPHORYLATION

<400> 7

```

Met Glu Val  Pro Gln Pro Glu Pro Ala Pro Gly Ser Ala Leu Ser Pro
1              5              10              15

Ala Gly Val  Cys Gly Gly Ala Gln Arg Pro Gly His Leu Pro Gly Leu
20              25              30

Leu Leu Gly Ser His Gly Leu Leu Gly Ser Pro Val Arg Ala Ala Ala
35              40              45

Ser Ser Pro Val Thr Thr Leu Thr Gln Thr Met His Asp Leu Ala Gly
50              55              60

Leu Gly Ser Glu Thr  Pro Lys Ser Gln Val  Gly Thr Leu Leu Phe Arg
65              70              75              80

Ser Arg Ser Arg Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Arg Arg Ala Ser Glu
85              90              95

Ser Ser Leu Ser Ser Glu Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ala Gly Leu Cys
100             105             110

Met Asp Ser Pro Ser Pro Met Asp Pro His Met Ala Glu Gln Thr Phe
115             120             125

Glu Gln Ala Ile Gln Ala Ala Ser Arg Ile Ile Arg Asn Glu Gln Phe
130             135             140

Ala Ile Arg Arg Phe Gln Ser Met Pro Val Arg Leu Leu Gly His Ser
145             150             155             160

Pro Val Leu Arg Asn Ile Thr Asn Ser Gln Ala Pro Asp Gly Arg Arg
165             170             175

Lys Ser Glu Ala Gly Ser Gly Ala Ala Ser Ser Ser Gly Glu Asp Lys
180             185             190

Glu Asn Val Arg Phe Trp Lys Ala Gly Val Gly Ala Leu Arg Glu Glu
195             200             205

Glu Gly Ala Cys Trp Gly Gly Ser Leu Ala Cys Glu Asp Pro Pro Leu
210             215             220

Pro Ser Trp Leu Gln Asp Gly Phe Val Phe Lys Met Pro Trp Lys Pro
225             230             235             240

Thr His Pro Ser Ser Thr His Ala Leu Ala Glu Trp Ala Ser Arg Arg
245             250             255

Glu Ala Phe Ala Gln Arg Pro Ser Ser Ala Pro Asp Leu Met Cys Leu
260             265             270

Ser Pro Asp Arg Lys Met Glu Val Glu Glu Leu Ser Pro Leu Ala Leu
275             280             285

Gly Arg Phe Ser Leu Thr Pro Ala Glu Gly Asp Thr Glu Glu Asp Asp
290             295             300

Gly Phe Val Asp Ile Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asp Leu Val Met Tyr
305             310             315             320

```

Ser Lys Cys Gln Arg Leu Phe Arg Ser Pro Ser Met Pro Cys Ser Val
 325 330 335
 Ile Arg Pro Ile Leu Lys Arg Leu Glu Arg Pro Gln Asp Arg Asp Thr
 340 345 350
 Pro Val Gln Asn Lys Arg Arg Arg Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu Gln
 355 360 365
 Gln Glu Ala Glu Glu Pro Lys Ala Arg Val Leu Arg Ser Lys Ser Leu
 370 375 380
 Cys His Asp Glu Ile Glu Asn Leu Leu Asp Ser Asp His Arg Glu Leu
 385 390 395 400
 Ile Gly Asp Tyr Ser Lys Ala Phe Leu Leu Gln Thr Val Asp Gly Lys
 405 410 415
 His Gln Asp Leu Lys Tyr Ile Ser Pro Glu Thr Met Val Ala Leu Leu
 420 425 430
 Thr Gly Lys Phe Ser Asn Ile Val Asp Lys Phe Val Ile Val Asp Cys
 435 440 445
 Arg Tyr Pro Tyr Glu Tyr Glu Gly Gly His Ile Lys Thr Ala Val Asn
 450 455 460
 Leu Pro Leu Glu Arg Asp Ala Glu Ser Phe Leu Leu Lys Ser Pro Ile
 465 470 475 480
 Ala Pro Cys Ser Leu Asp Lys Arg Val Ile Leu Ile Phe His Cys Glu
 485 490 495
 Phe Ser Ser Glu Arg Gly Pro Arg Met Cys Arg Phe Ile Arg Glu Arg
 500 505 510
 Asp Arg Ala Val Asn Asp Tyr Pro Ser Leu Tyr Tyr Pro Glu Met Tyr
 515 520 525
 Ile Leu Lys Gly Gly Tyr Lys Glu Phe Phe Pro Gln His Pro Asn Phe
 530 535 540
 Cys Glu Pro Gln Asp Tyr Arg Pro Met Asn His Glu Ala Phe Lys Asp
 545 550 555 560
 Glu Leu Lys Thr Phe Arg Leu Lys Thr Arg Ser Trp Ala Gly Glu Arg
 565 570 575
 Ser Arg Arg Glu Leu Cys Ser Arg Leu Gln Asp Gln
 580 585

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/001416

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N9/16 C07K16/40 A61K38/43 A61P35/00 G01N33/68
G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N G01N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No |
|------------|---|----------------------|
| A | WO 02/099110 A (TAIHO PHARMACEUTICAL CO LTD ; NAKANISHI MAKOTO (JP)) 12 December 2002 (2002-12-12) abstract & EP 1 396 545 A (TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.; NAKASHINI, MAKOTO (JP)) 10 March 2004 (2004-03-10) page 1 - page 4 | |
| A | BULAVIN DV ET AL.: "Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase" NATURE, vol. 411, 3 May 2001 (2001-05-03), pages 102-107, XP002277361 * abrégé, page 106, figures 2,4 * ----- -/-- | |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex

* Special categories of cited documents

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 November 2004

Date of mailing of the international search report

06/12/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schmidt, Harald

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/001416

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No |
|------------|--|----------------------|
| A | <p>DAVEZAC N ET AL.: "Human pEG3 kinase associates with and phosphorylates CDC25B phosphatase: a potential role for pEg3 in cell cycle regulation"</p> <p>ONCOGENE, vol. 21, no. 50, 31 October 2002 (2002-10-31), pages 7630-7641, XP001190818 page 7634</p> <p>-----</p> | |
| A | <p>THEIS-FEBVRE N ET AL.: "Protein kinase CK2 regulates CDC25B phosphatase activity"</p> <p>ONCOGENE, vol. 22, no. 2, 16 January 2003 (2003-01-16), pages 220-232, XP001190817 page 224; figure 3</p> <p>-----</p> | |
| A | <p>BALDIN V ET AL.: "Nuclear Localization of CDC25B1 and Serine 146 Integrity Are Required for Induction of Mitosis"</p> <p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 38, 20 September 2002 (2002-09-20), pages 35176-35182, XP001190816 abstract; figures 1,2,5,7</p> <p>-----</p> | |
| P,X | <p>BALDIN V ET AL.: "PKB/Akt phosphorylates the CDC25B phosphatase and regulates its intracellular localisation"</p> <p>BIOLOGY OF THE CELL, vol. 95, no. 8, November 2003 (2003-11), pages 547-554, XP002277362 page 550 - page 553; figure 2</p> <p>-----</p> | 1-6 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/001416

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 02099110 | A | 12-12-2002 | EP 1396545 A1 | 10-03-2004 |
| | | | WO 02099110 A1 | 12-12-2002 |
| | | | US 2004151713 A1 | 05-08-2004 |
| <hr/> | | | | |
| EP 1396545 | A | 10-03-2004 | EP 1396545 A1 | 10-03-2004 |
| | | | US 2004151713 A1 | 05-08-2004 |
| | | | WO 02099110 A1 | 12-12-2002 |
| <hr/> | | | | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/001416

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N9/16 C07K16/40 A61K38/43 A61P35/00 G01N33/68
G01N33/543

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N G01N A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Categorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no des revendications visées |
|-------------|--|------------------------------|
| A | WO 02/099110 A (TAIHO PHARMACEUTICAL CO LTD ; NAKANISHI MAKOTO (JP)) 12 décembre 2002 (2002-12-12) abrégé & EP 1 396 545 A (TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.; NAKASHINI, MAKOTO (JP)) 10 mars 2004 (2004-03-10) page 1 - page 4 | |
| A | BULAVIN DV ET AL.: "Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase" NATURE, vol. 411, 3 mai 2001 (2001-05-03), pages 102-107, XP002277361 * abrégé, page 106, figures 2,4 * ----- -/-- | |



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

*** Catégories spéciales de documents cités**

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 novembre 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06/12/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P B 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Schmidt, Harald

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|--|------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no des revendications visées |
| A | <p>DAVEZAC N ET AL.: "Human pEG3 kinase associates with and phosphorylates CDC25B phosphatase: a potential role for pEg3 in cell cycle regulation"</p> <p>ONCOGENE, vol. 21, no. 50, 31 octobre 2002 (2002-10-31), pages 7630-7641, XP001190818 page 7634</p> <p>-----</p> | |
| A | <p>THEIS-FEBVRE N ET AL.: "Protein kinase CK2 regulates CDC25B phosphatase activity"</p> <p>ONCOGENE, vol. 22, no. 2, 16 janvier 2003 (2003-01-16), pages 220-232, XP001190817 page 224; figure 3</p> <p>-----</p> | |
| A | <p>BALDIN V ET AL.: "Nuclear Localization of CDC25B1 and Serine 146 Integrity Are Required for Induction of Mitosis"</p> <p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 38, 20 septembre 2002 (2002-09-20), pages 35176-35182, XP001190816 abrégé; figures 1,2,5,7</p> <p>-----</p> | |
| P,X | <p>BALDIN V ET AL.: "PKB/Akt phosphorylates the CDC25B phosphatase and regulates its intracellular localisation"</p> <p>BIOLOGY OF THE CELL, vol. 95, no. 8, novembre 2003 (2003-11), pages 547-554, XP002277362 page 550 - page 553; figure 2</p> <p>-----</p> | 1-6 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2004/001416

| Document brevet cité au rapport de recherche | | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|---|------------------------|---|------------------------|
| WO 02099110 | A | 12-12-2002 | EP 1396545 A1 | 10-03-2004 |
| | | | WO 02099110 A1 | 12-12-2002 |
| | | | US 2004151713 A1 | 05-08-2004 |
| EP 1396545 | A | 10-03-2004 | EP 1396545 A1 | 10-03-2004 |
| | | | US 2004151713 A1 | 05-08-2004 |
| | | | WO 02099110 A1 | 12-12-2002 |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.